



Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP

Escola de Farmácia



Thaís Godinho Pontífice

AVALIAÇÃO DO USO DA TÉCNICA DE FRACIONAMENTO EM CAMPO DE
FLUXO ASSIMÉTRICO COM DETECÇÃO DE FLUORESCÊNCIA NA
CARACTERIZAÇÃO DA HIDROFOBICIDADE DE SUPERFÍCIE DE
NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

Ouro Preto

Junho 2019

Thaís Godinho Pontífice

Avaliação do uso da técnica de fracionamento em campo de fluxo assimétrico com detecção de fluorescência na caracterização da hidrofobicidade de superfície de nanopartículas poliméricas

*Monografia apresentada ao
Curso de Farmácia da
Universidade Federal de Ouro
Preto como parte dos requisitos
para a obtenção do Grau de
Farmacêutica.*

Universidade Federal de Ouro Preto - UFOP

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Carla Furtado Mosqueira

Co-orientadora: Dra. Gwenaelle Elza Nathalie Pound-Lana

Ouro Preto

Junho 2019

P811a Pontífice, Thaís Godinho.
Avaliação do uso da técnica de fracionamento em campo de fluxo assimétrico com detecção de fluorescência na caracterização da hidrofobicidade de superfície de nanopartículas poliméricas [manuscrito] / Thaís Godinho Pontífice. - 2019.

49f.: il.: color; grafs; tabs.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vanessa Carla Furtado Mosqueira.
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Gwenaelle Elza Nathalie Pound-Lana.

Monografia (Graduação). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Departamento de Farmácia.

1. Nanopartículas poliméricas. 2. Compostos fotossensibilizantes. 3. Hidrofobicidade. I. Mosqueira, Vanessa Carla Furtado. II. Pound-Lana, Gwenaelle Elza Nathalie . III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 620.3Catalogação: ficha.sisbin@ufop.edu.br




MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO


Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP

Escola de Farmácia




ATA DA SESSÃO DE DEFESA DA 441ª MONOGRAFIA DO CURSO DE FARMÁCIA DA ESCOLA DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO. Aos 27 dias do mês de junho de dois mil e dezenove, quinta-feira, realizou-se, a partir das 16 horas e 20 minutos, no Auditório da Escola de Farmácia, no Campus Morro do Cruzeiro, a sessão de defesa de monografia da candidata ao grau de Farmacêutico Generalista, **Thaís Godinho Pontífice**, matrícula 14.2.2286, intitulada **Avaliação do uso da técnica de fracionamento em campo de fluxo assimétrico com detecção de fluorescência na caracterização da hidrofobicidade de superfície de nanopartículas poliméricas**. A Banca Examinadora foi constituída pela doutoranda Maria Alice de Oliveira, CIPHARMA/EF/UFOP, pela doutoranda Marina Guimarães Carvalho, CIPHARMA/EF/UFOP, e pela orientadora Profa. Dra. Vanessa Carla Furtado Mosqueira, DEFAR/EF/UFOP. De acordo com o regulamento do Curso, a orientadora, presidente da banca, abriu a sessão, passando a palavra à candidata, que fez a exposição do seu trabalho. Em seguida, foi realizada a arguição pelos examinadores na ordem registrada acima, com a respectiva defesa da candidata. Finda a arguição, a Banca Examinadora se reuniu, sem a presença da candidata e do público, tendo deliberado pela sua aprovação, com a NOTA 8,0. Comunicou-se a candidata que essa nota somente será liberada para a PROGRAD, após a entrega do exemplar definitivo de acordo com as normas estabelecidas pelo Sistema de Bibliotecas e Informação (Sisbin), Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), com as devidas correções sugeridas pela banca, com o aval escrito da orientadora. Nada mais havendo para constar, a presente ata foi lavrada por Gustavo Franco Campos, secretário do Colegiado de Farmácia, que após a leitura pública da mesma seguirá assinada pelos membros da Banca Examinadora e pela Presidente do Colegiado. Ouro Preto, 27 de junho de 2019.


Profª. Dra. Vanessa Carla Furtado Mosqueira
(orientadora)


Doutoranda Maria Alice de Oliveira


Doutoranda Marina Guimarães Carvalho


Profª. Dra. Glenda Nicioli da Silva
Presidente do Colegiado de Farmácia

Dedico aos meus pais, minha irmã, meu namorado e amigos que contribuíram para a conclusão desse trabalho e também pelo apoio e incentivo a batalhar na conquista e realização dos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre estar olhando por mim, por me dar saúde e forças para continuar e alcançar os meus sonhos.

Agradeço a minha família em especial meus pais Belmiro e Sara, por toda paciência, apoio em todas as necessidades, incentivo e reconhecimento.

A minha irmã Sabrina por todo incentivo e ajuda. Sem você não teria chegado até aqui com força e sempre pensando nunca desistir.

Ao Bruno por todo amor, paciência e apoio. Você foi essencial para que eu tivesse forças para continuar nessa reta final.

Aos amigos que fiz durante a graduação, em especial o Marcelo, Luiza, Jéssica, Pablo, Talita, Sabrina, Márcia, Paula, Rúbia e Amanda, só tenho a agradecer pela amizade, pela torcida de todos vocês e por tornarem meus dias melhores.

A todos os meus amigos de Ouro Preto, Andrea, Carol, Sabrina, Márcio e Samira, pelo apoio dado, e pela torcida dada a mim.

A Dra. Gwenaelle Pound-Lana pelo por todo aprendizado, paciência, confiança e por contribuir tanto para a realização desse trabalho. Sou muito grata a você por me ensinar tanto.

A Professora Dra. Vanessa Mosqueira pela oportunidade e confiança.

Ao Laboratório de Desenvolvimento Galênico e Nanobiotecnologia (LDGnano) pelos anos de trabalho e aprendizado e a todos os membros, em especial a Maria Alice, Marina, Elisa, Patrícia e Renata, pela boa vontade e disponibilidade em me ajudar e ensinar.

Agradeço a Escola de Farmácia (EFAR), por todos esses anos de aprendizado, crescimento tanto intelectual como pessoal.

A Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), por tudo que foi proporcionado a mim.

*“Se não puder voar, corra,
se não puder correr, ande,
se não puder andar, rasteje,
mas continue em frente de qualquer jeito.”*

Martin Luther King

RESUMO

A hidrofobicidade de superfície de nanopartículas poliméricas empregadas como nanocarreadores de fármacos é uma das características físico-químicas que mais influenciam as suas performances *in vitro* e *in vivo*. No entanto, os métodos disponíveis para avaliar a hidrofobicidade de materiais são de difícil aplicação aos sistemas nanoparticulados em meio coloidal, tais como os nanocarreadores farmacêuticos do tipo nanocápsulas oleosas e nanoesferas poliméricas. Portanto, propomos avaliar o uso da técnica de fracionamento em campo de fluxo assimétrico (AF4) para auxiliar na aplicação do método de adsorção do Rosa Bengala, padrão de ouro na caracterização de hidrofobicidade de superfície de nanopartículas. A técnica de AF4 é usada para separar macromoléculas e coloides nanométricos em suspensão aquosa, e mediando um conjunto de detector em série, pode ser usada, como proposto aqui, para caracterizar as propriedades de espalhamento de luz laser (para determinar o tamanho das nanopartículas) em conjunto com as propriedades de absorção UV-Vis e de fluorescência das nanopartículas em frações monodispersas de tamanho. Nesse trabalho, o Rosa Bengala e outros marcadores fluorescentes de natureza lipofílica ou anfifílica (Rodamina B, IR780, fluoresceína e ftalocianina de cloroalumínio), foram avaliados comparando o seu comportamento fotofísico na presença de nanopartículas poliméricas. Quando associado à superfície das nanopartículas e/ou quando em meio aquoso, o marcador fluorescente Rosa Bengala sofreu alterações quanto à sua capacidade de absorver em comprimento de onda específico e de emitir fluorescência, não sendo o marcador mais adequado para ser usado em conjunto com a técnica de AF4. Por espectrofotometria de absorção UV-VIS a Rodamina B é o marcador que menos sofreu alterações no seu comportamento fotofísico quando associado às nanopartículas poliméricas. Além disso, a Rodamina B mostrou intensa fluorescência em meio aquoso, e, portanto, foi escolhida para estudo de adsorção às nanopartículas em meio aquoso por AF4. Entretanto ao avaliar o marcador fluorescente Rodamina B associado às nanocápsulas oleosas e nanoesferas por AF4 foi observada a marcação seletiva de uma fração das nanopartículas de tamanho reduzido dentro da amostra total. Consequentemente, esse estudo mostra o potencial da técnica de AF4 em estudar detalhadamente a adsorção de marcador fluorescente a nanopartículas poliméricas, mas evidencia ao mesmo tempo limitações devidas à perda de fluorescência dos marcadores em meio aquoso.

Palavras-chave: Nanopartículas poliméricas, Rosa Bengala, marcadores fluorescentes, Fracionamento em campo de fluxo assimétrico (AF4).

ABSTRACT

The surface hydrophobicity of polymer nanoparticles employed as drug nanocarriers is one of the physico-chemical characteristics that most influence their *in vitro* and *in vivo* performances. However, the methods available for assessing the hydrophobicity of materials are difficult to apply to nanoparticulate systems in colloidal medium, such as the oil nanocapsule-type nanocarriers and polymer nanospheres. Therefore, we propose to evaluate the use of the asymmetric flow field fractionation technique (AF4) to aid in the application of the Rose Bengal adsorption method, gold standard in the characterization of surface hydrophobicity of nanoparticles. The AF4 technique is used to separate macromolecules and nanometric colloids into aqueous suspension, and mediating a series detector array, can be used, as proposed herein, to characterize the laser light scattering properties (to determine nanoparticle size) together with the UV-Vis absorption and fluorescence properties of the nanoparticles in monodisperse size fractions. In this work, Rose Bengal and other fluorescent markers of lipophilic or amphiphilic nature (Rhodamine B, IR780, fluorescein and chloraluminum phthalocyanine) were evaluated by comparing their photophysical behavior in the presence of polymer nanoparticles. When associated with the surface of the nanoparticles and / or when in aqueous media, the fluorescent pink marker has undergone changes in its ability to absorb at specific wavelengths and emit fluorescence and is not the most appropriate marker to be used in conjunction with AF4 technique. By UV-VIS absorption spectrophotometry, Rhodamine B is the marker that has undergone the least changes in its photophysical behavior when associated with polymer nanoparticles. In addition, Rhodamine B showed intense fluorescence in aqueous medium, and, therefore, was chosen for the study of adsorption to nanoparticles in aqueous medium by AF4. However, when evaluating the fluorescent marker Rhodamine B associated with the oil nanocapsules and nanospheres by AF4, the selective labeling of a fraction of the reduced size nanoparticles within the total sample was observed. Consequently, this study shows the potential of the AF4 technique in studying in detail the adsorption of fluorescent marker to polymer nanoparticles, but at the same time shows limitations due to the loss of fluorescence of the markers in aqueous media.

Key words: Polymer nanoparticles, Rose Bengal, fluorescent markers, Asymmetric flow field fractionation (AF4).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultados obtidos de NC de PCL e PLGA por espalhamento de luz dinâmica, microeletroforese acoplada à anemometria de laser Doppler e espectrofluorimetria.	32
Tabela 2: Absorbâncias obtidas a partir de espectrofotometria UV-Vis do aumento da concentração de nanocápsulas oleosas com solução de Rose Bengal em meio aquoso.....	33
Tabela 3: Resultados obtidos de NS e NC de PEG5kPLA20k por espalhamento de luz dinâmica, microeletroforese acoplada à anemometria de laser Doppler e espectrofluorimetria.	37
Tabela 4: Influência da concentração de nanoesferas na absorbância da luz visível dos marcadores Rodamina B, IR780, Fluoresceína e Ftalocianina em solução aquosa.	39
Tabela 5: Influência da concentração de nanocápsulas oleosas na absorbância da luz visível dos marcadores Rodamina B, IR780, Fluoresceína e Ftalocianina em solução aquosa.....	39

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1:** Absorção do marcador Rosa Bengala associados a nanocápsulas oleosas por espectrofotometria UV-VIS.....33
- Gráfico 2:** Absorção dos marcadores fluorescentes Rodamina B, IR780, Fluoresceína e Ftalocianina de cloro e alumínio associados a nanoesferas e nanocápsulas em meio aquoso .40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Classificação das estruturas dos nanocarreadores.....	18
Figura 2: Estrutura química do Rosa Bengala.....	20
Figura 3: Representação da medição do ângulo de contato	21
Figura 4: Esquema representativo do fracionamento em campo	22
Figura 5: Preparo de nanopartículas poliméricas pelo método de nanoprecipitação.	25
Figura 6: Método do Rosa Bengala convencional	27
Figura 7: Fractogramas do Rosa Bengala adsorvido a superfície de NC por fracionamento em campo de fluxo assimétrico	28
Figura 8: Estudo de adsorção de Rosa Bengala (RB)	29
Figura 9: Esquema representativo das leituras das absorbâncias por espectrofotometria UV-Vis.....	31
Figura 10: Estudo de absorção da luz visível do Rosa Bengala na presença de nanocápsulas oleosas	32
Figura 11: Estrutura química dos marcadores fluorescentes.....	35
Figura 12: Estudo de absorção da luz visível dos marcadores livres Rodamina B, IR780, Fluoresceína e Ftalocianina de cloro e alumínio em meio aquoso.....	38
Figura 13: Espectros de absorção da maior concentração de nanocápsulas oleosas e nanoesferas em meio aquoso	38
Figura 14: Espectro do sinal de detecção de fluorescência da Rodamina B em concentrações crescentes de NS de PEG5kPLA20k.....	43
Figura 15: Estudo AF4 da adsorção do marcador Rodamina B a nanoesferas de PEG5kPLA20k.....	44
Figura 16: Estudo AF4 da adsorção do marcador Rodamina B a nanocápsulas oleosas de PEG5kPLA20k.....	45
Figura 17: Comparação entre a intensidade do sinal e sinal de fluorescência para Rodamina B adsorvida a NC.	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Absorbância
AF4	Fracionamento em campo de fluxo assimétrico
AlCIPc	Ftalocianina de cloro e alumínio
DLS	Espalhamento de luz dinâmica
FLD	Detector de emissão de fluorescência
IR780	Iodeto IR-780
KO/W	Coefficiente de partição
MALS	Espalhamento de luz estática ou em multi-ângulos
Mn	Distribuição do tamanho
NC	Nanocápsula
nm	nanômetros
NP	Nanopartícula polimérica
NS	Nanoesfera
PCL	Poli(ϵ -caprolactona)
PEG	Polietileno glicol
PEG-PLA	Poli(lactídeo)-bloco-poli(etilenoglicol)
PLA	Polilactídeo
PLGA	Poli(lactídeo-co-glicolídeo)
RB	Rosa Bengala
UV-Vis	Espectrofotometria no ultravioleta visível
λ	Comprimento de onda

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 NANOCARREADORES	18
2.2 POLÍMEROS	19
2.3 ROSA BENGALA	20
2.3.1 COEFICIENTE DE PARTIÇÃO	20
2.3.2 ÂNGULO DE CONTATO	21
2.3.3 MÉTODO DE ADSORÇÃO	21
2.3.4 MÉTODO A E B	22
2.3.5 FRACIONAMENTO EM FLUXO DE CAMPO DE FLUXO ASSIMÉTRICO (AF4)	22
3. JUSTIFICATIVA	23
4. OBJETIVO GERAL	24
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
5. CAPÍTULO 1: ESTUDO PRELIMINAR DE ADSORÇÃO DO ROSA BENGALA ÀS NANOCÁPSULAS PELO MÉTODO CONVENCIONAL E POR FRACIONAMENTO EM CAMPO DE FLUXO ASSIMÉTRICO.	25
5.1 METODOLOGIA	25
5.1.1 PREPARO DE NANOESFERAS E NANOCÁPSULAS	25
5.1.2 CARACTERIZAÇÃO DE TAMANHO DOS NANOCARREADORES	26
5.3 AVALIAÇÃO DA HIDROFOBICIDADE DE SUPERFÍCIE DOS NANOCARREADORES PELO MÉTODO DO ROSA BENGALA CONVENCIONAL	26
5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
6. CAPÍTULO 2: ESTUDO DA ADSORÇÃO DE MARCADORES FLUORESCENTES À SUPERFÍCIE DE NANOPARTÍCULAS POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS	30
6.2 METODOLOGIA	30
6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32

7. CAPÍTULO 3: ESTUDO COMPLEMENTAR DA ADSORÇÃO DE MARCADORES FLUORESCENTES À SUPERFÍCIE DE NANOPARTÍCULAS UTILIZANDO ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS	35
7.1 METODOLOGIA.....	35
7.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
8. CAPÍTULO 4: QUANTIFICAÇÃO DA FLUORESCÊNCIA DA RODAMINA B POR AF4	42
8.1 METODOLOGIA.....	42
8.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
9. CONCLUSÃO	47
10. REFERÊNCIAS	48

1. INTRODUÇÃO

Nanocarreadores preparados a partir de polímeros biodegradáveis estão sendo amplamente utilizados como sistemas de vetorização de fármacos. Os polímeros usados para encapsulação de fármacos são de caráter lipofílico e ao entrarem em contato com o meio aquoso precipitam e formam reservatórios capazes de encapsular e liberar fármacos de forma controlada (KUMARI, *et al.*, 2010).

A composição química da superfície dos nanocarreadores influencia na sua interação com o meio biológico, apresentando um sistema que não será reconhecido pelo sistema de defesa do organismo, atuando de forma localizada e controlada. Assim é de suma importância determinar as características da superfície dos nanocarreadores, como a sua hidrofobicidade, que tem papel primordial na interação com proteínas dos fluidos biológicos e células no organismo (TRINDADE *et al.*, 2018).

Os métodos de caracterização da hidrofobicidade de superfície de nanopartículas poliméricas (NP) foram comparados por Xiao e Wiesner (2012). Dentre as opções disponíveis, o método de adsorção do Rosa Bengala é o mais usado na área de nanocarreadores farmacêuticos para a sua caracterização em estudos pré-clínicos (GESSNER, *et al.*, 2000, GAUMET, *et al.*, 2009).

A técnica descrita por Gessner e colaboradores (2000) relaciona a adsorção do marcador fluorescente Rosa Bengala à superfície de materiais através da determinação da fração do marcador livre no meio aquoso, sendo o resto adsorvido na partícula em suspensão. Quanto maior a fração de marcador associado à superfície da partícula, mais alta está a sua hidrofobicidade de superfície, sendo assim possível determinar um valor numérico para comparar a hidrofobicidade de superfície de nanocarreadores de composição distintas.

No entanto uma etapa necessária consiste na separação das nanopartículas do meio de suspensão para quantificar o marcador presente na fase aquosa contínua, geralmente pelo método de ultracentrifugação. Entretanto o tamanho nanométrico das nanopartículas dificulta uma separação efetiva, retendo as menores partículas na fase contínua (XIAO e WIESNER, 2012).

Por isso será avaliada uma técnica alternativa de caracterização da superfície de nanopartículas poliméricas, o fracionamento em campo de fluxo assimétrico (AF4), sem que haja a separação das nanopartículas do seu meio de dispersão. Buscando detectar a fluorescência das

nanopartículas associadas a marcadores fluorescentes e possíveis alterações fotofísicas dos mesmos quando estão em meio aquoso.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Nanocarreadores

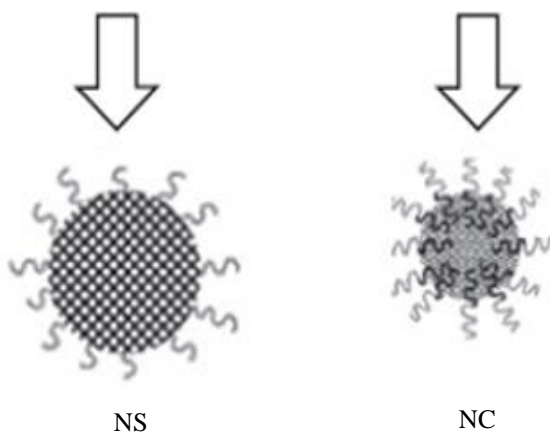
Os nanocarreadores estão sendo amplamente utilizados como uma estratégia para melhorar a eficácia da terapia contra o câncer, atuando de forma localizada. Podem proporcionar proteção do fármaco a ação do organismo e absorção adequada do medicamento no tecido lesado (VIEIRA, *et al.*, 2016).

Existem vários tipos de nanocarreadores poliméricos (NP). Dentro desses destacam-se as nanoesferas (NS) e nanocápsulas (NC), representadas na figura 1.

As NS apresentam um núcleo polimérico maciço, constituindo um sistema matricial aprisionando o fármaco, ao passo que as NC apresentam um núcleo oleoso revestido pelo polímero e ambos são estabilizados por um polímero ou surfactante hidrofílico na sua interface com a fase externa aquosa.

Os diâmetros das NC podem variar de 50-300 nm e das NS menores do que 100 nm de acordo com o preparo das NP (SCHAFFAZICK, *et al.*, 2003), podendo ser caracterizados como sistemas nanométricos.

Figura 1: Classificação das estruturas dos nanocarreadores



Fonte: XIAO, RZ; *et al.*, 2010

A partir do preparo de NS e NC com diferentes polímeros, é importante avaliar as propriedades de superfície desses nanocarreadores (COTY, *et al.*, 2017), pois cada polímero apresentará interação diferente com o meio biológico. Dessa forma, técnicas de caracterização de hidrofobicidade de superfície de materiais tem sido desenvolvida e estão sendo adaptadas para o caso específico dos nanomateriais (XIAO, Y; WIESNER, MR., 2012). Dentre elas a técnica de adsorção do Rosa Bengala é a mais empregada para a caracterização de nanocarreadores farmacêuticos (COTY, *et al.*, 2017).

2.2 Polímeros

Polímeros sintéticos biodegradáveis são amplamente utilizados como insumos farmacêuticos, em biomateriais (implantes, suturas, próteses) e em sistemas de vetorização de fármacos, devido ao seu caráter biodegradável e à sua segurança (SCHAFFAZICK, *et al.*, 2003).

Poliésteres biodegradáveis, tais como o polilactídeo (PLA), poli(lactídeo-co-glicolídeo) (PLGA) e poli(ϵ -caprolactona) (PCL) apresentam caráter lipofílico e portanto precipitam em meio aquoso formando um reservatório para a encapsulação de fármacos lipofílicos (D'ADDIO, *et al.*, 2012). Os sistemas de vetorização nanoparticulados a base de poliésteres biodegradáveis, podem exercer uma liberação controlada do fármaco após administração (TYLER, *et al.*, 2016).

Já o polietileno glicol (PEG), possuem características anfifílicas. Estes são usados para estabilizar a parte hidrofóbica dos nanocarreadores, permanecendo na interface entre o reservatório hidrofóbico (poliéster) e o meio externo aquoso (KUMARI, *et al.*, 2010). Dessa forma as NP quando estão em meio biológico não serão eliminados pelo sistema de defesa, podendo atuar de forma localizada e controlada.

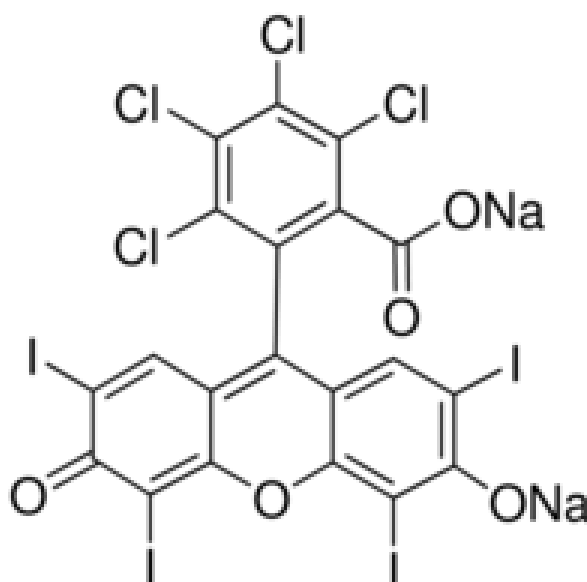
A composição química do polímero selecionado para formar o nanocarreador pode alterar a sua capacidade de carga, taxa de encapsulação e a cinética de liberação do fármaco (KAMALY, *et al.*, 2016).

Além disso a hidrofobicidade de superfície dos nanocarreadores, relacionada à composição química do polímero, influencia em sua associação com células, podendo alterar o seu comportamento *in vitro* (GESSNER, *et al.*, 2000; TRINDADE, *et al.*, 2018) e *in vivo* (OLIVEIRA, *et al.*, 2017).

2.3 Rosa Bengala

O Rosa Bengala (RB) é um marcador de xanteno com absorção no visível utilizado como fotossensibilizador, e como marcador fluorescente (MIELKE e ZIMEHL, 2001, citado por, apud, conforme, DOKTOROVOVA, *et al.*, 2012), representados na figura 2. Apresenta caráter anfifílico e, portanto, maior adsorção aos nanocarreadores conforme aumenta sua hidrofobicidade (XIAO, Y; WIESNER, MR., 2012). Possui comprimento de onda (λ) máximo de absorção de 549 nm, comprimentos de onda máximos de excitação e emissão de fluorescência de 525 nm e 560 nm, em acetonitrila, respectivamente (valores determinados experimentalmente no nosso laboratório).

Figura 2: Estrutura química do Rosa Bengala



Fonte: Sigma-Aldrich

Métodos para determinação da hidrofobicidade de nanocarreadores:

2.3.1 Coeficiente de partição

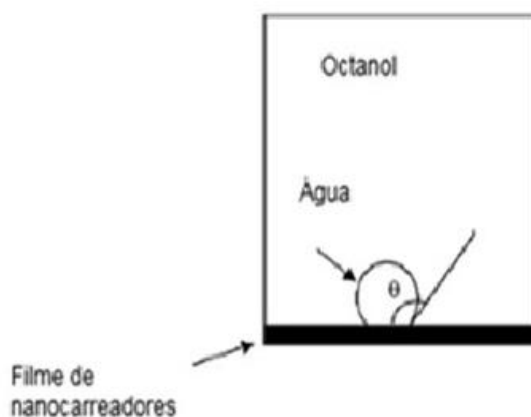
Essa técnica consiste na determinação do coeficiente de partição ($K_{O/W}$) das nanopartículas entre dois meios de partição, o meio hidrofóbico (n-octanol) e hidrofílico (água). Materiais hidrofóbicos tendem a se acumular em maior proporção na fase n-octanol. O valor de $K_{O/W}$ dos nanocarreadores são calculados a partir do acumulado em cada fase sobre a concentração inicial das nanopartículas. A técnica oferece uma medida quantitativa da hidrofobicidade dos nanocarreadores (XIAO, Y; WIESNER, MR., 2012).

$$K_{O/W} = \frac{[\text{Concentração da fase oleosa}]}{[\text{Concentração da fase aquosa}]}$$

2.3.2 Ângulo de contato

O ângulo de contato é medido por um microscópio analisador de gota. A medida é realizada em uma placa contendo uma fina camada de nanopartículas previamente filtradas e liofilizadas em meio de octanol. Deve ser adicionado à placa uma gota de água para iniciar a medição do ângulo de contato entre o filme, a água e o octanol, conforme a figura 3 (XIAO, Y; WIESNER, MR., 2012).

Figura 3: Representação da medição do ângulo de contato



Fonte: XIAO, Y; WIESNER, MR, 2012.

2.3.3 Método de adsorção

O teste de adsorção do Rosa Bengala é realizado incubando por 3 horas o marcador RB a temperatura ambiente (25°C), neste o RB é adicionado em concentração fixa a suspensões das NP em concentrações crescentes (MULLER, *et al.*, 1997). Em seguida centrifugar a suspensão de NP contendo o RB, para que sejam removidas a partir da dispersão. O sobrenadante obtido corresponde a fração livre do RB, que indica a fração que não foi adsorvida à superfície da partícula, sendo determinados por espectrofotometria de UV-Vis em um λ máximo de 549nm, referentes ao máximo de absorção do RB em meio aquoso (DOKTOROVOVA, *et al.*, 2012).

Foram realizados métodos modificados exemplificados por Doktorovova (2012):

2.3.4 Método A e B

O processo de incubação do método A seguiu o mesmo do método descrito anteriormente. Para o método B o tempo de incubação foi de 2 horas com uma alta concentração de RB. A centrifugação foi realizada apenas no método B. O sobrenadante em B foi quantificado por espectrofotometria do UV-Vis em λ de 549 nm e a absorbância refere-se à fração livre do marcador. A quantificação em A é realizada pela diferença da absorbância das NP incubadas com o RB pelas NP brancas (sem marcador associado). (DOKTOROVOVA, *et al.*, 2012).

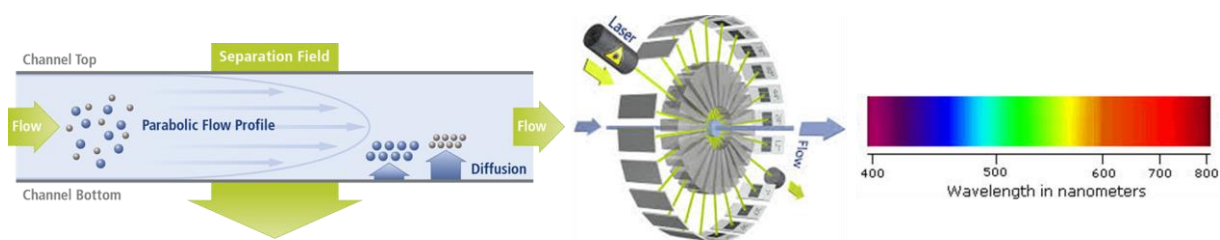
As modificações dos métodos foram para observar o comportamento do marcador quando foram realizadas centrifugação ou não. E a escolha de adicionar elevadas concentrações de marcador foi uma condição forçada na qual as NP precipitariam, facilitando a remoção do meio de dispersão. Entretanto esse método não é adequado para NC, apenas para nanopartículas lipídicas sólidas catiônicas.

2.3.5 Fracionamento em Fluxo de Campo de Fluxo Assimétrico (AF4)

Técnica utilizada para determinação do tamanho de partículas, distribuição de tamanho e morfologia de nanocarreadores. É a única técnica acoplada a detecção de fluorescência disponível para a verificação da associação do marcador fluorescente às nanopartículas em meio coloidal sem etapas adicionais de separação ou preparo de amostra (MILLER, *et al.*, 2012).

O AF4 é acoplado a quatro detectores em série, sendo eles: Absorção UV, fluorescência (FLD), espalhamento de luz dinâmica (DLS) e espalhamento de luz estática (MALS), exemplificados na figura 4. Os raios hidrodinâmicos e de giração são determinados a partir do sinal de DLS e MALS, respectivamente, a partir das quais por meio de cálculo se determina o fator de forma dos nanocarreadores (ZATTONI, *et al.*, 2014).

Figura 4: Esquema representativo do fracionamento em campo de fluxo assimétrico



Fonte: Postnova

Disponível em: <http://www.postnova.com/overview_759.html>. Acesso em: 10 Out 2018.

3. JUSTIFICATIVA

Nanopartículas poliméricas desempenham um papel de suma importância para sistema de vetorização de fármacos, por apresentarem caráter biodegradável e segurança biológica. Diante dessa atuação é de suma importância avaliar a hidrofobicidade da superfície desses nanocarreadores em meio biológico, para que exerçam um papel localizado e não sejam eliminados pelo sistema de defesa (VIEIRA, *et al.*, 2016).

O método descrito na literatura para a determinação de hidrofobicidade de superfície de nanocarreadores é o método de adsorção do Rose Bengal, porém, nesse método convencional é necessário quantificar a fração de marcador adsorvido na partícula em relação à fração livre. É essencial para reprodutibilidade do método separar as nanopartículas poliméricas do seu meio de dispersão, onde se usa em geral a ultracentrifugação. Entretanto, suspensões aquosas de nanocápsulas oleosas apresentam densidade muito próxima ao seu meio de dispersão aquoso, sendo que a centrifugação não leva à formação de *pellet* para realizar a sua separação do meio de dispersão (DOKTOROVOVA, *et al.*, 2012).

Diante desta dificuldade técnica de separação pelas técnicas tradicionais, este trabalho avaliou uma alternativa ao método de adsorção do Rose Bengal para caracterizar a hidrofobicidade de superfície de nanocápsulas poliméricas. Com isso suspensões coloidais foram submetidas a uma separação do meio aquoso usando a técnica de fracionamento em campo de fluxo assimétrico (AF4) visando caracterizar a adsorção de marcador fluorescente na partícula em meio coloidal. A técnica de separação AF4 permite, em um único experimento sem a necessidade previa de preparo da amostra, determinar o tamanho e distribuição de tamanhos, morfologia dos nanocarreadores e quantificar a fluorescência associada à partícula em meio coloidal.

As frações eluídas do sistema de AF4 são caracterizadas por detectores de espalhamento de luz estática (MALS) e dinâmica (DLS), para a determinação de tamanho, e de fluorescência (FLD) para a detecção de marcador fluorescente associado às nanopartículas.

Pelo conjunto das técnicas AF4-DLS-MALS-FLD consequentemente visamos complementar o método do Rose Bengal já descrito na literatura para a caracterização da hidrofobicidade da superfície de nanopartículas com a caracterização direta do marcador adsorvido nas nanopartículas sem preparo anterior da amostra.

4. OBJETIVO GERAL

Avaliar o uso da técnica de fracionamento em campo de fluxo assimétrico (AF4) com detecção de fluorescência na caracterização da hidrofobicidade de superfície de nanopartículas poliméricas.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar e caracterizar nanopartículas poliméricas (NP) a partir de polímeros biodegradáveis com grau de hidrofobicidade distintas PCL, PLA, PLGA, PEG-PLA;
- Aplicar o método de adsorção do marcador fluorescente Rosa Bengala convencional para caracterizar a hidrofobicidade de superfície das nanopartículas;
- Avaliar o efeito da adsorção do marcador Rosa Bengala nas NP nas propriedades fotofísicas do marcador em meio aquoso;
- Avaliar o comportamento fotofísico de marcadores fluorescentes, como a, Rodamina B, IR780, Fluoresceína, Ftalocianina de cloro e alumínio quando adsorvidos a superfície de nanopartículas poliméricas.
- Avaliar o uso da técnica de AF4 para determinar a quantidade do marcador fluorescente associado à superfície das nanopartículas.

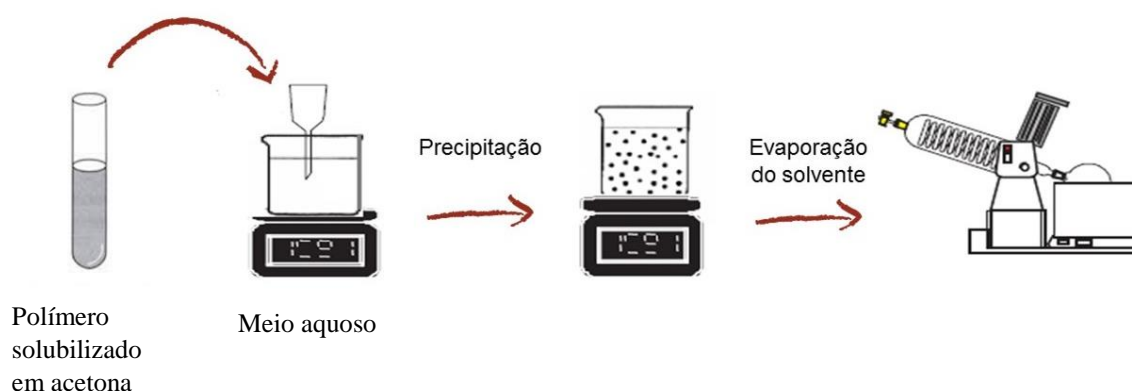
5. CAPÍTULO 1: ESTUDO PRELIMINAR DE ADSORÇÃO DO ROSA BENGALA ÀS NANOCÁPSULAS PELO MÉTODO CONVENCIONAL E POR FRACIONAMENTO EM CAMPO DE FLUXO ASSIMÉTRICO.

5.1 Metodologia

5.1.1 Preparo de nanoesferas e nanocápsulas

Nanoesferas e nanocápsulas poliméricas foram preparadas pelo método de nanoprecipitação de polímeros (FESSI, *et al.*, 1989), sendo esses o poli(lactídeo-co-glicolídeo) (PLGA), polilactídeo (PLA), poli(ϵ -caprolactona) (PCL), polilactídeo (PLA), Poli(lactídeo)-bloco-poli(etilenoglicol) (PEG-PLA), pré-selecionados, como indicados na Figura 5.

Figura 5: Preparo de nanopartículas poliméricas pelo método de nanoprecipitação.



Para o preparo das NS, o polímero pré-selecionado foi pesado em uma balança analítica (20 mg), solubilizado em um *vial* com acetona (4 mL). Após solubilização, vertido com o auxílio de uma seringa de plástico em um balão de fundo redondo (50 mL) contendo água ultrapura (8 mL) e um agitador magnético, sendo mantido sob agitação (360 rpm) durante 10 minutos. A suspensão foi concentrada sob pressão reduzida em um rotavapor para evaporar a acetona (117 mbar) e parte da água (9 mbar) mantendo-se o balão a 25°C, até um volume final de suspensão coloidal de 2 mL.

Para o preparo de NC foi pesada a lecitina de sódio (Lipoid S75; 15 mg) e o polímero pré-selecionado (16 mg) em uma balança analítica. Eles foram solubilizados em um *vial* contendo acetona (2 mL) sob agitação magnética (300 rpm) a 70°C e em acetona (2 mL) a temperatura ambiente, respectivamente. A solução de Lipoid foi vertida à solução de polímero, o Miglyol (50 μ L) foi adicionado e mantidos sob agitação por 5 minutos para homogeneização. Com o

auxílio de uma seringa de plástico a mistura foi vertida em um balão de fundo redondo (50 mL) contendo água ultrapura (10 mL) e uma barra magnética e mantida sob agitação (360 rpm) por 10 minutos. A suspensão foi concentrada sob pressão reduzida em um rotavapor para evaporação completa da acetona (117 mbar) e parte da água (9 mbar) mantendo-se o balão a 35°C, até um volume final de suspensão coloidal de 2,0 mL.

5.1.2 Caracterização de tamanho dos nanocarreadores

A distribuição de tamanho dos nanocarreadores foi determinada pela técnica de fracionamento em campo de fluxo assimétrico (AF4) acoplado a quatro detectores em série, de absorção UV, fluorescência (FLD), espalhamento de luz dinâmica (DLS) e espalhamento de luz estática (MALS).

As amostras foram preparadas em *vials* de cromatografia contendo *insert* de 250 µL, onde foram adicionados volumes crescentes de nanopartículas (0, 27, 54, 80 µL) contendo RB adsorvido e completados para 240 µL com NaCl aquoso (10 mM).

As amostras foram adicionadas ao amostrador automático do equipamento de AF4, que foi mantido à temperatura de 37°C sem alterar as condições necessárias para a análise das amostras, conforme descrito em Pound-Lana e colaboradores (2018). Os detectores de fluorescência foram ajustados para os parâmetros de análise em $\lambda_{\text{excitação}}$: 527 nm e $\lambda_{\text{emissão}}$: 572 nm, alta sensibilidade e ganho $\times 16$. Também foi acoplada a cubeta de fluxo do AF4 ao DLS para a leitura completa das amostras em sequência.

5.3 Avaliação da hidrofobicidade de superfície dos nanocarreadores pelo método do Rosa Bengala convencional

O método de adsorção do RB foi incubado as nanopartículas em concentrações crescentes em uma solução de Rosa Bengala em uma concentração fixa de 20 µg/mL, por 3 horas à temperatura ambiente. Após incubação, as suspensões foram ultrafiltradas (Filtro Amicon™ 50 kDa) e centrifugadas de forma a remover as nanopartículas da fase contínua aquosa e quantificado o RB no sobrenadante, ou seja, o marcador na sua forma livre, como demonstrado na Figura 6.

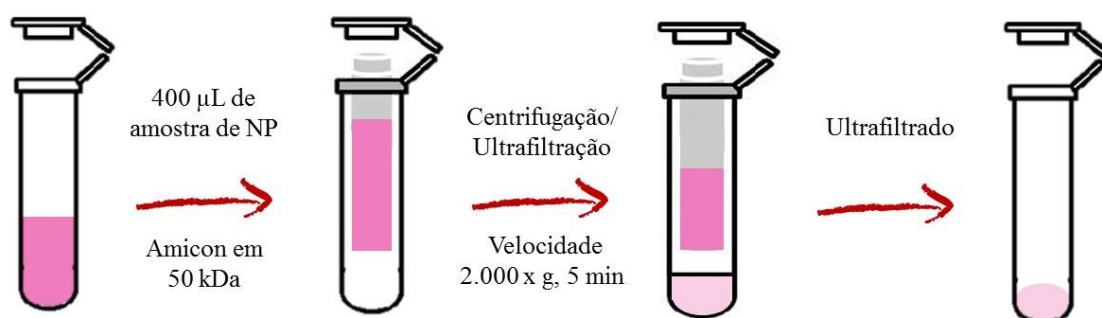
A quantificação foi realizada por espectrofotometria UV-Vis, em que através do volume do sobrenadante (50 a 100 µL) foi adicionada acetonitrila: água (90:10) para a obtenção do volume

final de 2 mL. A solução foi vertida na cubeta de quartzo e iniciada a leitura, como descrito em Trindade e colaboradores (2018).

A quantidade de marcador associado às nanopartículas foi assim calculado como a diferença da absorvância do total de marcador na suspensão e a absorvância da fração livre na fase continua.

$$\text{Adsorção de Rosa Bengala} = \text{Fluorescência total} - \text{fluorescência no ultrafiltrado}$$

Figura 6: Método do Rosa Bengala convencional



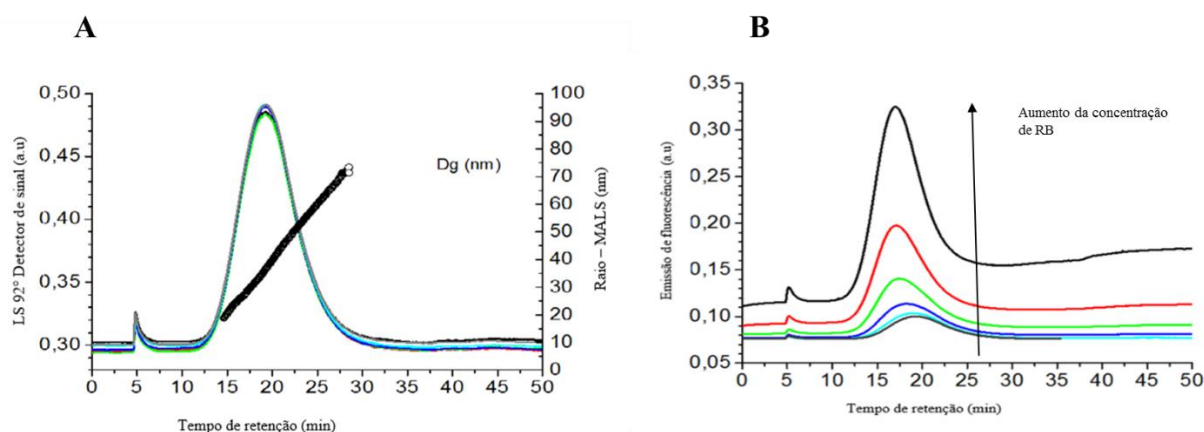
5.4 Resultados e discussão

As NC foram avaliadas pelas técnicas de espectrofotometria de fluorescência e AF4 para avaliar a influência da concentração de Rosa Bengala no sinal de fluorescência.

Pela técnica de AF4 as NC contendo o marcador adsorvido em concentrações crescentes (0 a 20 $\mu\text{g/mL}$) em passos de 4 $\mu\text{g/mL}$ de marcador. Como pode ser visto na figura 7 (A) a intensidade do sinal (LS 92° - MALS), foram obtidos diâmetros de partículas que variaram de 30 a 150 nm. E a presença do marcador RB associado as NC não alterou o tamanho das mesmas.

Obteve-se também um sinal de fluorescência com $\lambda_{\text{excitação}}$ 527 nm e de $\lambda_{\text{emissão}}$ 572 nm, associados às NC, indicando que o RB está adsorvido a superfície das partículas. Como também indicados, a intensidade da fluorescência aumentou com o aumento da concentração de RB na suspensão indicado na figura 7 (B).

Figura 7: Fractogramas do Rosa Bengala adsorvido a superfície de NC por fracionamento em campo de fluxo assimétrico



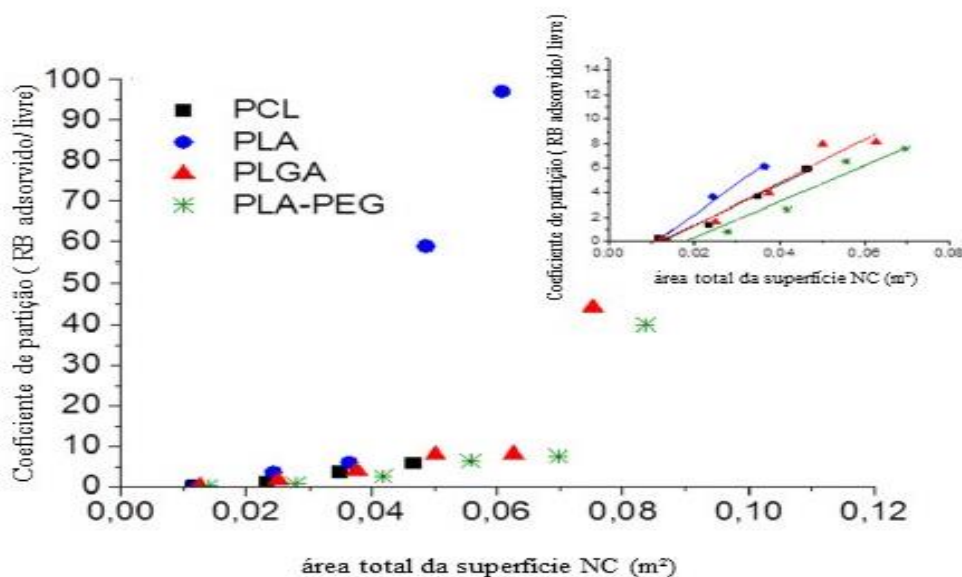
Em A, concentrações de 0 a 20 $\mu\text{g/mL}$ em passos de 4 $\mu\text{g/mL}$, e em B, o aumento da intensidade do sinal de fluorescência aumenta com o aumento da concentração de Rosa Bengala quando associados as nanocápsulas oleosas.

A avaliação do estudo do método convencional de adsorção do Rosa Bengala foi publicada em Trindade e colaboradores (2018).

Onde pode-se observar que quanto maior a concentração de NC incubada com o marcador, menor a quantidade de RB livre presente no ultrafiltrado, independente do polímero utilizado. O gráfico relacionando o coeficiente de partição em função da área superficial total das NC (TRINDADE 2018) representado na figura 8, resultou em uma linha reta. A inclinação da reta nas concentrações mais baixas é usada para comparar a hidrofobicidade das partículas (com o

aumento da concentração de NC, o RB livre tende a ficar escasso ou esgotado no meio). Os valores obtidos aumentaram na ordem de PEG-PLA < PLGA ~ PCL < PLA, indicando que não seguiu a ordem de hidrofobicidade dos polímeros baseados no seu Log P (PEG-PLA < PLGA < PLA < PCL), apresentando porem diferenças pequenas entre os coeficientes de partição para as NC de diferentes polímeros.

Figura 8: Estudo de adsorção de Rosa Bengala (RB)



A função da área de superfície foi de 167, 203, 177 e 148m² para nanocápsulas de PCL, PLA, PLGA e PEG-PLA, respectivamente.

Diante dos resultados obtidos pode-se concluir que a técnica de AF4 apresenta um potencial na determinação de marcador adsorvido na superfície de NP por ser capaz de identificar a associação do marcador às NP e observar um aumento na fluorescência associadas as NP em função da concentração do marcador presente no meio. Entretanto quando o marcador RB está em meio aquoso e/ou quando está associado à superfície das NP ele altera suas características fotofísicas, o que reduz muito a intensidade de fluorescência. Dessa forma acredita-se que a escolha de outros marcadores fluorescentes que não sofram alterações nas propriedades fotofísicas de fluorescência seja necessária para caracterizar a hidrofobicidade das NP.

Por meio do método convencional do Rose Bengal, pelas NC foram observadas diferenças na ordem de hidrofobicidade das NC e os coeficientes de partição para as NC de diferentes polímeros, sendo assim, este não pode ser representativo para caracterizar a hidrofobicidade das NC.

6. CAPÍTULO 2: ESTUDO DA ADSORÇÃO DE MARCADORES FLUORESCENTES À SUPERFÍCIE DE NANOPARTÍCULAS POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-Vis

No contexto de estudos de determinação da lipofilicidade de superfície de nanocarreadores poliméricos, buscou-se determinar a quantidade de marcador Rose Bengal adsorvido à superfície de NP em meio aquoso. O presente estudo é precedido de trabalho preliminar por espectroscopia UV-VIS para avaliar variações no comportamento fotofísico do Rose Bengal e de outros fluorocromos em meio aquoso relacionadas à presença de NP.

6.2 Metodologia

Concentrações crescentes de nanopartículas foram adicionadas a uma solução de marcador em meio aquoso e foram realizadas medidas de absorvância por espectroscopia no UV-Vis. Foi determinado o comprimento de onda máximo de absorção do marcador fluorescente verificando a ocorrência ou não de deslocamento devido à presença das NP, e o valor de absorvância nesse comprimento de onda, em função da concentração em nanopartículas.

Para isso suspensões de nanocápsulas oleosas (NC) foram preparadas pelo método de nanoprecipitação, utilizando PCL ($M_n=27100$ g/mol, $D = 2,6$) e PLGA ($M_n=22100$ g/mol, $D = 1,83$), concentração de 8 mg de polímero/mL de formulação, conforme descrito por Trindade e colaboradores (2018).

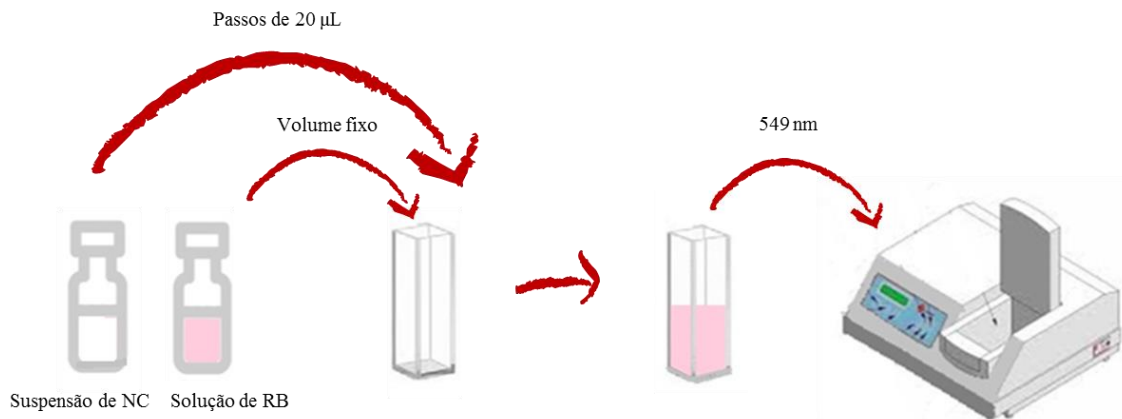
O marcador fluorescente RB foi solubilizado em etanol a uma concentração de 5 mg/mL para o preparo de uma solução estoque, posteriormente diluída em água de forma a se obter uma absorvância em torno de 0,9. A essa solução de RB foram adicionadas suspensões de NC por passos de 20 μ L a um volume inicial de 2 mL na cubeta (adição de 40 μ g/mL de polímero a cada passo, 8 leituras no total) e determinando a absorvância, como indicado na figura 9. O mesmo processo foi realizado para a aquisição dos espectros das NP sem marcador, adicionando-se as NC a 2 mL de água ultrapura.

Foram adquiridos os espectros na região do máximo de absorção do marcador em um λ 549 nm para verificar o valor de absorvância da NC branca, RB livre e RB com a maior concentração de NC.

Foi subtraído o valor de absorvância das NP sem marcador ao valor de absorvância do marcador em cada concentração testada para levar em consideração a interferência das NC e elaborar um gráfico relacionando a absorvância à concentração de polímero na cubeta ($\mu\text{g/mL}$).

Absorvância final = Absorvância do marcador adsorvido a NC – Absorvância NC brancas

Figura 9: Esquema representativo das leituras das absorvâncias por espectrofotometria UV-Vis



6.3 Resultados e discussão

Estudos de caracterização dessas NC foram realizados por espalhamento de luz dinâmica (DLS), microeletroforese acoplada à anemometria de laser Doppler e espectrofluorimetria, indicados na tabela 1:

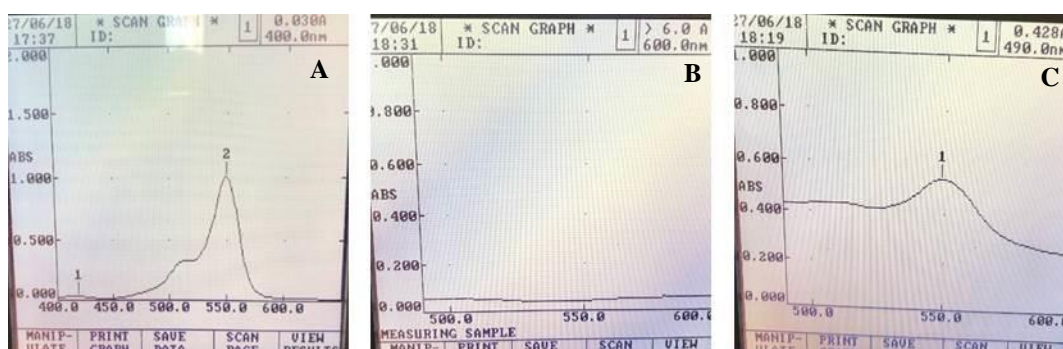
Tabela 1: Resultados obtidos de NC de PCL e PLGA por espalhamento de luz dinâmica, microeletroforese acoplada à anemometria de laser Doppler e espectrofluorimetria.

Polímero	Diâmetro hidrodinâmico	Índice de polidispersão	Potencial Zeta
PCL	183 ± 0,76	0,145	-37,8 ± 1,03.
PLGA	142 ± 0,68	0,220	- 35,4,7 ± 2,31

O valor de absorvância do RB foi de 0,757 em uma concentração de 20 µg/mL em água.

O espectro de absorção do marcador RB em meio aquoso (20 µg/mL) apresenta um máximo de absorção no comprimento de onda de 549 nm (Figura 10A). As NC brancas em meio aquoso apresentaram baixa ou nenhuma absorção (Figura 10B), e quando associadas ao RB em concentração máxima de 320 µg/mL há absorção com um deslocamento do comprimento de onda máximo (Figura 10C).

Figura 10: Estudo de absorção da luz visível do Rosa Bengala na presença de nanocápsulas oleosas



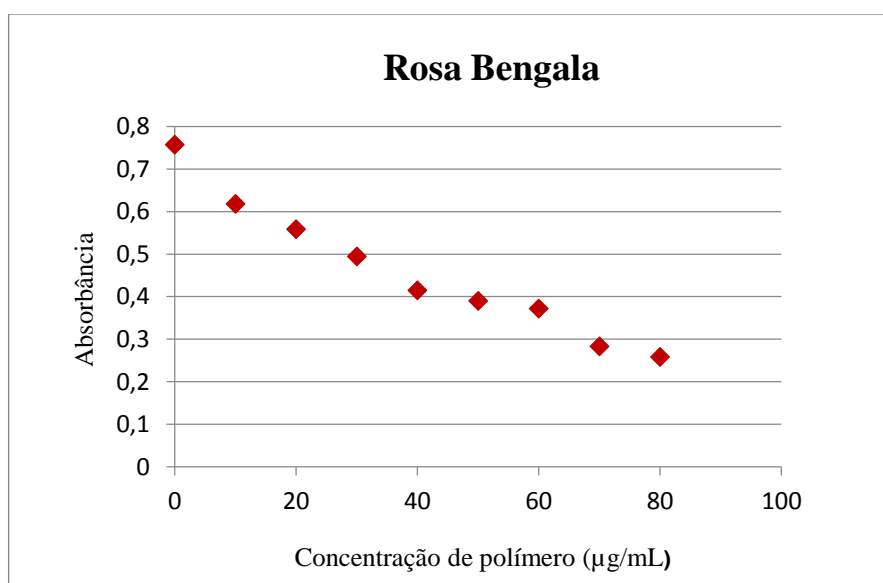
Espectros de absorção do RB em meio aquoso (A), das NC brancas em suspensão aquosa (B) e do RB a NC na concentração máxima de 320 µg/mL (C).

A partir da leitura de todas as amostras, organizou-se os dados em uma tabela, tabela 2, possibilitando a construção do gráfico de Absorbância × concentração de polímero (µg/mL), como indicado no gráfico 4.

Tabela 2: Absorbâncias obtidas a partir de espectrofotometria UV-Vis do aumento da concentração de nanocápsulas oleosas com solução de Rose Bengal em meio aquoso

Vial	Volume de NC	Concentração de NC (µg/mL)	Absorbância do RB com NC a 549nm	Absorbância da NC branca a 549nm	Absorbância final
0	0	0	0,757	0	0,757
1	10	40	0,66	0,042	0,618
2	20	80	0,631	0,073	0,558
3	30	120	0,607	0,113	0,494
4	40	160	0,523	0,108	0,415
5	50	200	0,534	0,144	0,39
6	60	240	0,551	0,179	0,372
7	70	280	0,529	0,246	0,283
8	80	320	0,538	0,28	0,258

Gráfico 1: Absorção do marcador Rosa Bengala associados a nanocápsulas oleosas por espectrofotometria UV-VIS



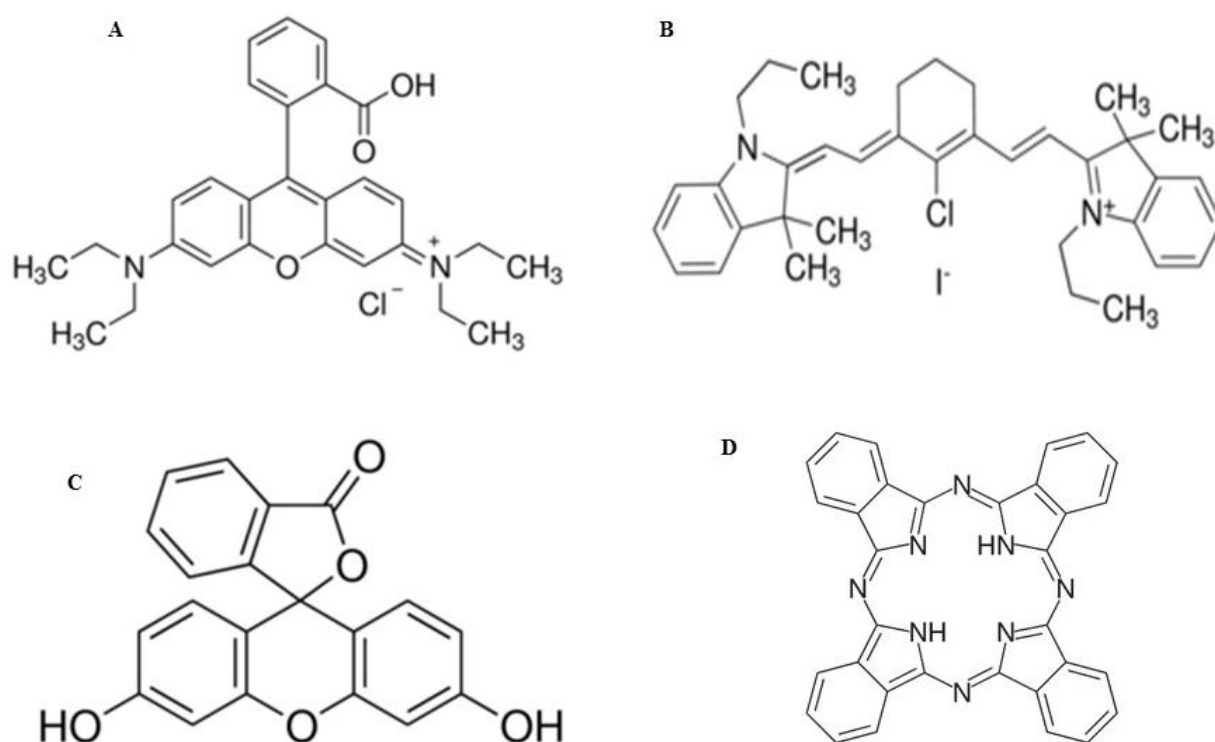
Ao observar os resultados conclui-se que o marcador apresenta o pico máximo em λ de 549 nm, entretanto ao adicionar concentrações crescentes de NC essa absorbância tende a diminuir gradativamente. Podendo inferir que o marcador não fica adsorvido à superfície da partícula ou perde sua capacidade de absorção quando está no meio aquoso.

Dessa forma, estudos com outros marcadores podem ser realizados a fim de comparar as absorvâncias em seus comprimentos de onda máximo pré-selecionados quando estão livres e quando estão adsorvidos a superfície das nanopartículas. E por fim determinar qual o marcador mais indicado para realização desse estudo.

7. CAPÍTULO 3: ESTUDO COMPLEMENTAR DA ADSORÇÃO DE MARCADORES FLUORESCENTES À SUPERFÍCIE DE NANOPARTÍCULAS UTILIZANDO ESPECTROFOTOMETRIA UV-Vis

Buscando complementar o estudo de Rosa Bengala de determinação da hidrofobicidade de superfície de nanocarreadores poliméricos, experimentos foram realizados por espectrofotometria UV-Vis com quatro marcadores diferentes, Rodamina B, IR780, Fluoresceína e Ftalocianina de cloro e alumínio, indicados na figura 11, a fim de determinar o comprimento de onda máximo de absorção, o comportamento fotofísico de cada um em meio aquoso, e quando associados a NP.

Figura 11: Estrutura química dos marcadores fluorescentes



Rodamina B em A, IR780 em B, Fluoresceína em C e Ftalocianina de cloro e alumínio em D

Fonte: Sigma-Aldrich

7.1 Metodologia

Foram utilizadas nanocápsulas oleosas (NC) e nanoesferas poliméricas (NS) diluídas, adicionadas em concentrações crescentes as soluções de marcadores observando a ocorrência

ou não do deslocamento do comprimento de onda na presença dessas NP, determinando os valores de absorbância de cada amostra.

Suspensões de nanoesferas (NS) e de nanocápsulas (NC) foram preparadas pelo método de nanoprecipitação a partir do polímero PEG_{5k}PLA_{20k} ($M_n=23200$ g/mol, $\bar{D} = 1,33$), com concentração de 10 mg polímero/mL para NS e 8 mg de polímero/mL de formulação, para NC.

Realizou-se o primeiro experimento com o marcador Rodamina B solubilizado em água ultrapura a uma concentração de 0,05 mg/mL para o preparo da solução estoque, diluído posteriormente para se obter como no procedimento do RB um valor de absorbância em torno de 0,9.

Seguidos de IR780 solubilizado em etanol a uma concentração de 0,05 mg/mL, diluído para uma concentração de 25 μ g/mL. A Fluoresceína solubilizada em água ultrapura com concentração inicial de 0,0834 mg/mL, diluída para uma concentração de 7,5 μ g/mL. A Ftalocianina de concentração de 1,0 mg/mL solubilizada em etanol, diluída para uma concentração final de 1,25 μ g/mL.

Preparadas as diluições em meio aquoso, de cada marcador foram adicionadas crescentes de NS e NC (NP diluídas 10 vezes, ao passo de 20 μ L no total de 15 amostras) para um volume final de 2 mL. A fim de retirar quaisquer interferentes vindos das NP, as amostras de NS e NC brancas foram lidas nas mesmas condições anteriores e as absorbâncias obtidas subtraídas dos valores obtidos pelos marcadores associados as NP.

7.2 Resultados e discussão

Foram caracterizadas por Espalhamento de luz dinâmica (DLS), DLS acoplado a microeletroforese acoplada à anemometria de laser Doppler e espectrofluorimetria, indicados na tabela 3:

Tabela 3: Resultados obtidos de NS e NC de PEG_{5k}PLA_{20k} por espalhamento de luz dinâmica, microeletroforese acoplada à anemometria de laser Doppler e espectrofluorimetria.

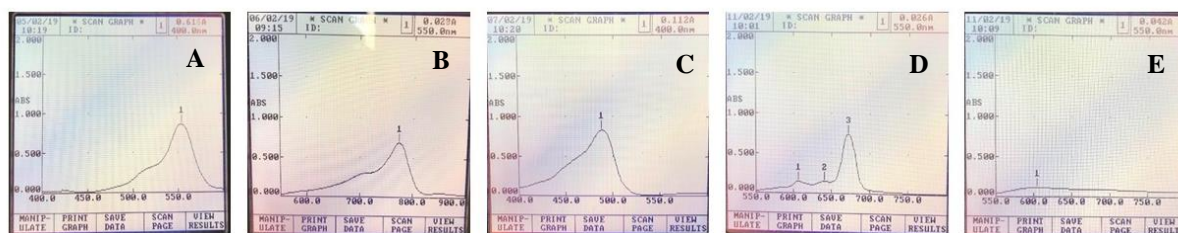
Nanopartículas poliméricas	Diâmetro hidrodinâmico	Índice de polidispersão	Potencial Zeta
NS	58,1 ± 0,23	0,2	-20,7 ± 13,4
NC	207 ± 2,6	0,274	-51,8 ± 0,173

A partir das leituras por espectrofotômetro UV-Vis as absorvâncias da Rodamina B a um λ de 554 nm em meio aquoso, foi de 0,847. O IR780 em meio aquoso com λ de 780 nm a 0,699. A Fluoresceína no λ de 489 nm a 0,833. E a Ftalocianina de cloro e alumínio com λ de 672, a 0,747

Espectros de absorção foram obtidos de cada marcador, em que a Rodamina B a 4 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 12A), IR780 a 25 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 12B), Fluoresceína a 7,5 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 12C) e leituras com a Ftalocianina de cloro e alumínio a 1,25 $\mu\text{g/mL}$ foram realizadas em etanol e meio aquoso, a fim de comparar o seu comportamento fotofísico, e pode-se observar que em meio aquoso sua absorvância diminui drasticamente (Figura 12D em etanol, E em meio aquoso).

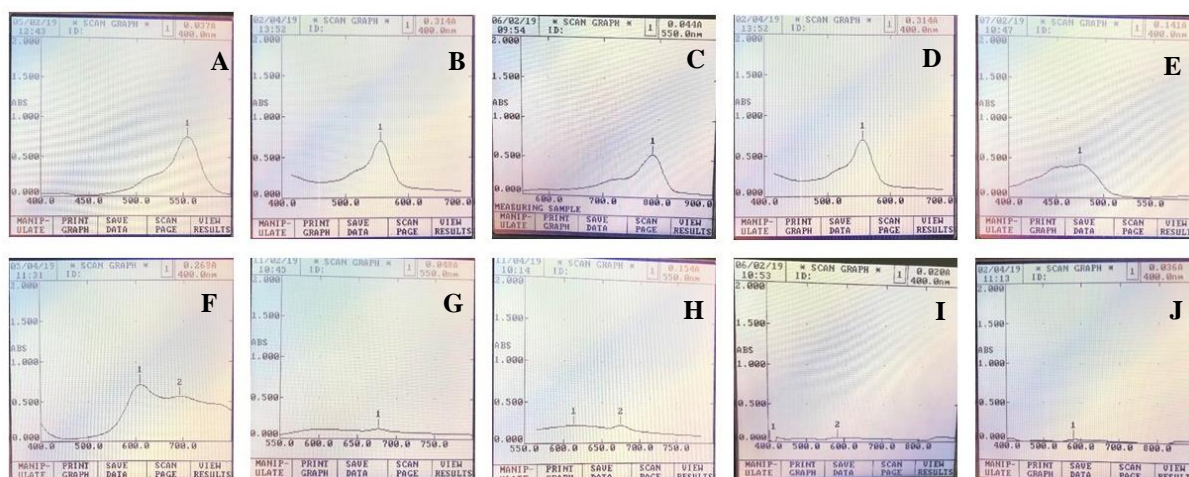
Foram obtidos também os espectros de absorção de RB adsorvido a superfície de NS e NC em suas concentrações máximas de 320 $\mu\text{g/mL}$, e espectros de NS e NC brancas, indicadas na figura 13.

Figura 12: Estudo de absorção da luz visível dos marcadores livres Rodamina B, IR780, Fluoroscéia e Ftalocianina de cloro e alumínio em meio aquoso.



Espectros de absorção da Rodamina B em meio aquoso (A), do IR780 em meio aquoso (B), da Fluoroscéia em meio aquoso (C), da Ftalocianina de cloro e alumínio em etanol (D), e da Ftalocianina de cloro e alumínio em meio aquoso (E).

Figura 13: Espectros de absorção da maior concentração de nanocápsulas oleosas e nanoesferas em meio aquoso



Espectros de NS na solução de Rodamina B (A), NC na solução de Rodamina B. (B), NS na solução de IR780 (C), NC na solução de IR780 (D), NS na solução de Fluoroscéia (E), NC na solução de Fluoroscéia (F), NS na solução de Ftalocianina de cloro e alumínio (G), NC na solução de Ftalocianina de cloro e alumínio (H), NS brancas (I), NC brancas (J).

A partir das leituras das amostras foram construídas tabelas, tabelas 4 e 5, referentes aos valores encontrados de absorbância de cada marcador por concentração de polímero e determinar o gráfico de Absorbância \times Concentração de polímero ($\mu\text{g/mL}$) referente a cada marcador indicados no gráfico 2.

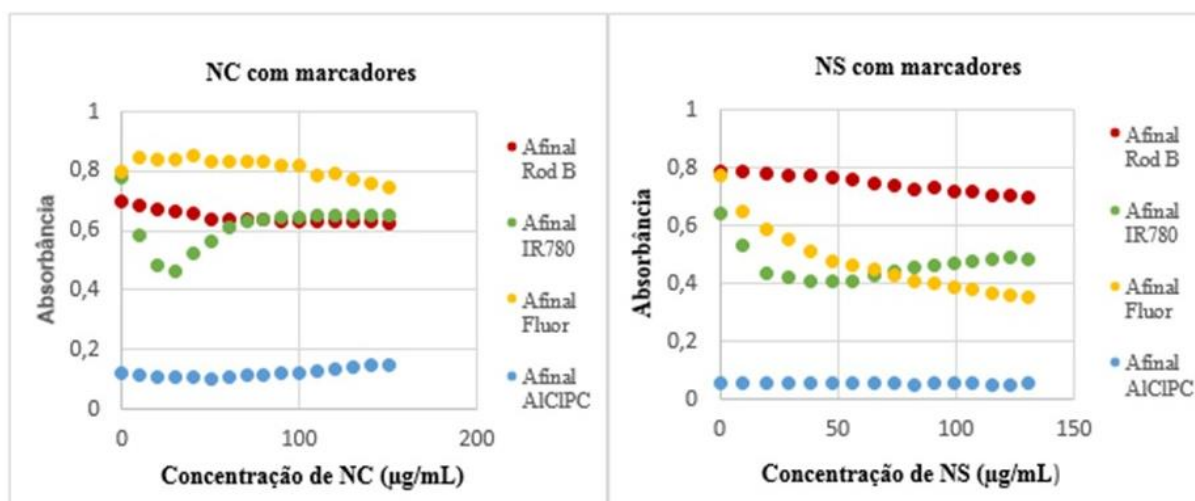
Tabela 4: Influência da concentração de nanoesferas na absorbância da luz visível dos marcadores Rodamina B, IR780, Fluoresceína e Ftalocianina em solução aquosa.

Vial	NS vol	Conc de NS (µg/mL)	A554 nm NS + Rodamina B	A780 nm NS + IR780	A480 nm NS + Fluoresceína	A550-800 nm NS + AICIPc	A500-900 nm branca	Afinal Rod B	Afinal IR780	Afinal Fluor	Afinal AICIPC
0	0	0	0,847	0,699	0,833	0,121	0,059	0,788	0,64	0,77	0,06
1	20	9,9	0,848	0,589	0,708	0,122	0,059	0,789	0,53	0,65	0,06
2	40	19,61	0,846	0,5	0,652	0,124	0,063	0,783	0,437	0,59	0,06
3	60	29,13	0,838	0,484	0,609	0,125	0,062	0,776	0,422	0,55	0,06
4	80	38,46	0,835	0,47	0,572	0,126	0,063	0,772	0,407	0,51	0,06
5	100	47,62	0,828	0,472	0,546	0,126	0,063	0,765	0,409	0,48	0,06
6	120	56,6	0,821	0,474	0,527	0,125	0,063	0,758	0,411	0,46	0,06
7	140	65,42	0,811	0,493	0,513	0,126	0,063	0,748	0,43	0,45	0,06
8	160	74,07	0,805	0,508	0,494	0,123	0,064	0,741	0,444	0,43	0,06
9	180	82,57	0,799	0,527	0,481	0,122	0,073	0,726	0,454	0,41	0,05
10	200	90,91	0,797	0,529	0,466	0,124	0,066	0,731	0,463	0,4	0,06
11	220	99,01	0,786	0,539	0,456	0,123	0,067	0,719	0,472	0,39	0,06
12	240	107,14	0,784	0,545	0,446	0,123	0,066	0,718	0,479	0,38	0,06
13	260	115,04	0,775	0,555	0,437	0,122	0,072	0,703	0,483	0,37	0,05
14	280	122,88	0,775	0,559	0,426	0,121	0,068	0,707	0,491	0,36	0,05
15	300	130,45	0,764	0,553	0,411	0,126	0,066	0,698	0,487	0,35	0,06

Tabela 5: Influência da concentração de nanocápsulas oleosas na absorbância da luz visível dos marcadores Rodamina B, IR780, Fluoresceína e Ftalocianina em solução aquosa.

Vial	NC vol	Conc de NC (µg/mL)	A554 nm NC + Rodamina B	A780 nm NC + IR780	A480 nm NC + Fluoresceína	A550-800 nm NC + AICIPc	A500-900 nm NC branca	Afinal Rod B	Afinal IR780	Afinal Fluor	Afinal AICIPC
0	0	0	0,733	0,813	0,833	0,154	0,035	0,698	0,778	0,798	0,119
1	20	10	0,729	0,63	0,89	0,158	0,045	0,684	0,585	0,845	0,113
2	40	20	0,726	0,534	0,895	0,164	0,053	0,673	0,481	0,842	0,111
3	60	30	0,724	0,525	0,898	0,169	0,062	0,662	0,463	0,836	0,107
4	80	40	0,721	0,588	0,912	0,173	0,062	0,659	0,526	0,85	0,111
5	100	50	0,719	0,642	0,912	0,178	0,078	0,641	0,564	0,834	0,1
6	120	60	0,718	0,691	0,91	0,183	0,078	0,64	0,613	0,832	0,105
7	140	70	0,716	0,706	0,908	0,19	0,078	0,638	0,628	0,83	0,112
8	160	80	0,715	0,713	0,907	0,194	0,078	0,637	0,635	0,829	0,116
9	180	90	0,712	0,72	0,899	0,2	0,078	0,634	0,642	0,821	0,122
10	200	100	0,711	0,723	0,894	0,202	0,078	0,633	0,645	0,816	0,124
11	220	110	0,709	0,729	0,864	0,207	0,078	0,631	0,651	0,786	0,129
12	240	120	0,707	0,732	0,869	0,212	0,078	0,629	0,654	0,791	0,134
13	260	130	0,706	0,732	0,852	0,217	0,078	0,628	0,654	0,774	0,139
14	280	140	0,706	0,732	0,834	0,225	0,078	0,628	0,654	0,756	0,147
15	300	150	0,704	0,732	0,823	0,225	0,078	0,626	0,654	0,745	0,147

Gráfico 2: Absorção dos marcadores fluorescentes Rodamina B, IR780, Fluoresceína e Ftalocianina de cloro e alumínio associados a nanoesferas e nanocápsulas em meio aquoso



Ao avaliar a adsorção dos marcadores alternativos ao RB à superfície das nanopartículas, foi observado que com o aumento das concentrações de NS e NC à solução de Rodamina B diminuiu a absorbância no λ máximo de absorção de 554nm. O mesmo acontece com o marcador Fluoresceína, exemplificados no gráfico 2.

O marcador IR780 solubilizado em etanol apresentou alta absorção no seu λ máximo de 780nm em meio aquoso. Entretanto quando adicionadas concentrações iniciais de NS e NC essa absorção diminuiu, podendo indicar baixa adsorção do marcador a superfície das partículas. Entretanto com concentrações maiores das NP essa absorção foi aumentando gradativamente, sugerindo que o marcador foi se associando à superfície das partículas, exemplificados no gráfico 2.

A Ftalocianina quando analisada em etanol apresenta alta absorção em um λ 672 nm podendo sugerir sua alta afinidade pelo solvente. Quando o marcador é adicionado a água, utilizada para realizar todas as medidas no espectrofotômetro, sua absorbância é reduzida drasticamente, apresentando absorção baixa no seu λ máximo de 672nm, exemplificados no gráfico 2.

A partir dos resultados por espectrofotometria UV-Vis entre a adsorção dos marcadores as NS e NC foi possível observar marcador mais indicado para esse estudo é a Rodamina B, pois foi o marcador que menos sofreu alterações na sua absorção em concentrações crescentes de NP e quando comparados com os demais marcadores.

A Ftalocianina de cloro e alumínio é o marcador que menos absorveu quando em meio aquoso e não houve mudanças significativas quando adicionados a solução de ambas as suspensões.

8. CAPÍTULO 4: QUANTIFICAÇÃO DA FLUORESCÊNCIA DA RODAMINA B POR AF4

A partir dos resultados obtidos por Espectrofotometria UV-Vis foi observado que o marcador que menos sofreu alteração fotofísica quando associado a NP foi a Rodamina B. Dessa forma realizou-se através do AF4 corridas com amostras de NS e NC brancas de PEG_{5k}PLA_{20k}, para determinar a fluorescência do marcador quando associado a NP e seu comportamento no meio.

8.1 Metodologia

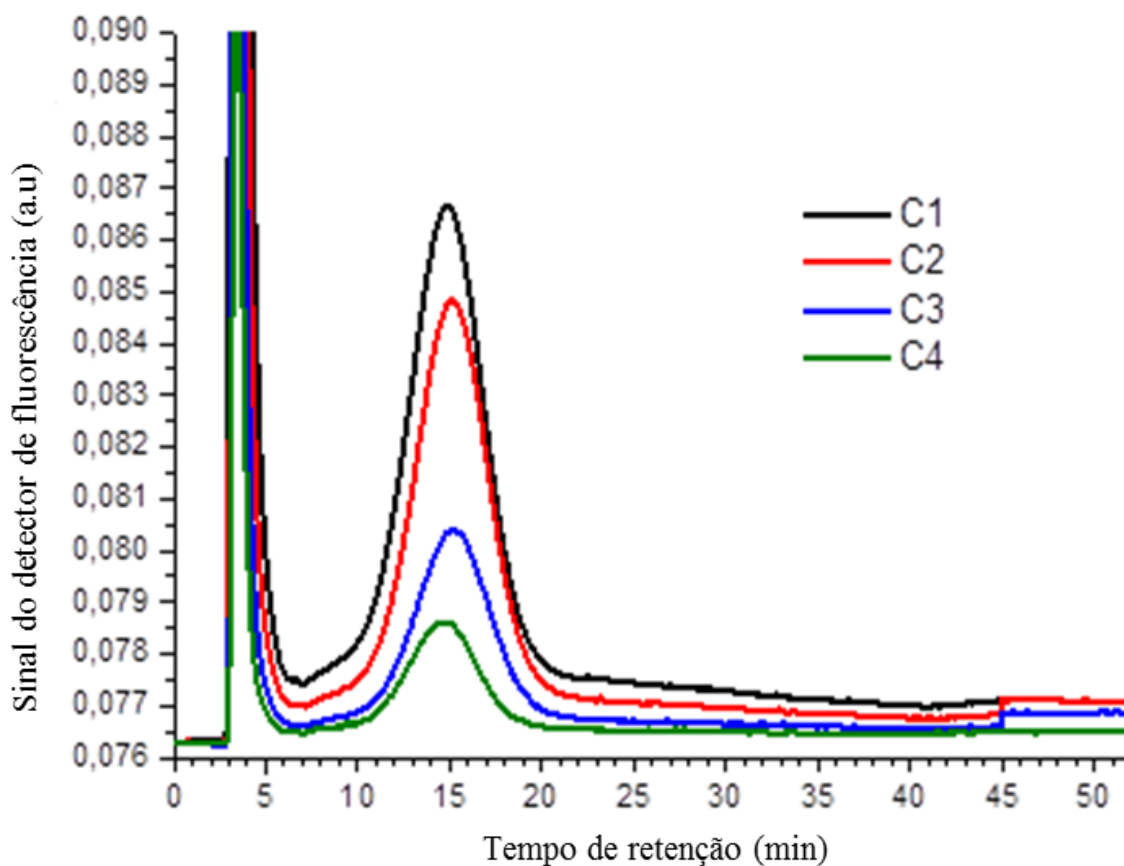
Concentrações crescentes de NS de PEG_{5k}PLA_{20k} (0,8 a 6,7 mg/mL de polímero) foram incubadas com o marcador Rodamina B a uma concentração fixa de (10 µg/mL para a corrida 1 e 5 µg/mL para a corrida 2). Para as NC de PEG_{5k}PLA_{20k} foram realizadas duas corridas com concentrações variadas de NP e de marcador (120 a 540 µg/mL de NC, com concentração fixa de marcador de 5 µg/mL e de 1 a 11 µg/mL de marcador com concentração de NC fixa de 360 µg/mL). As amostras foram preparadas em *insert* de frasco de 250 µL (volume total 240 µL, permitindo 2 injeções do mesmo frasco).

As leituras foram realizadas por um amostrador automático (Sens Med Gain x2) a uma temperatura de 25°C, a com um volume de injeção 20 µL e sinal de detecção no UV de λ de 554 nm, sinal de detecção de fluorescência (FLD) com $\lambda_{\text{excitação}}$ 527nm e $\lambda_{\text{emissão}}$ 572 nm.

8.2 Resultados e discussão

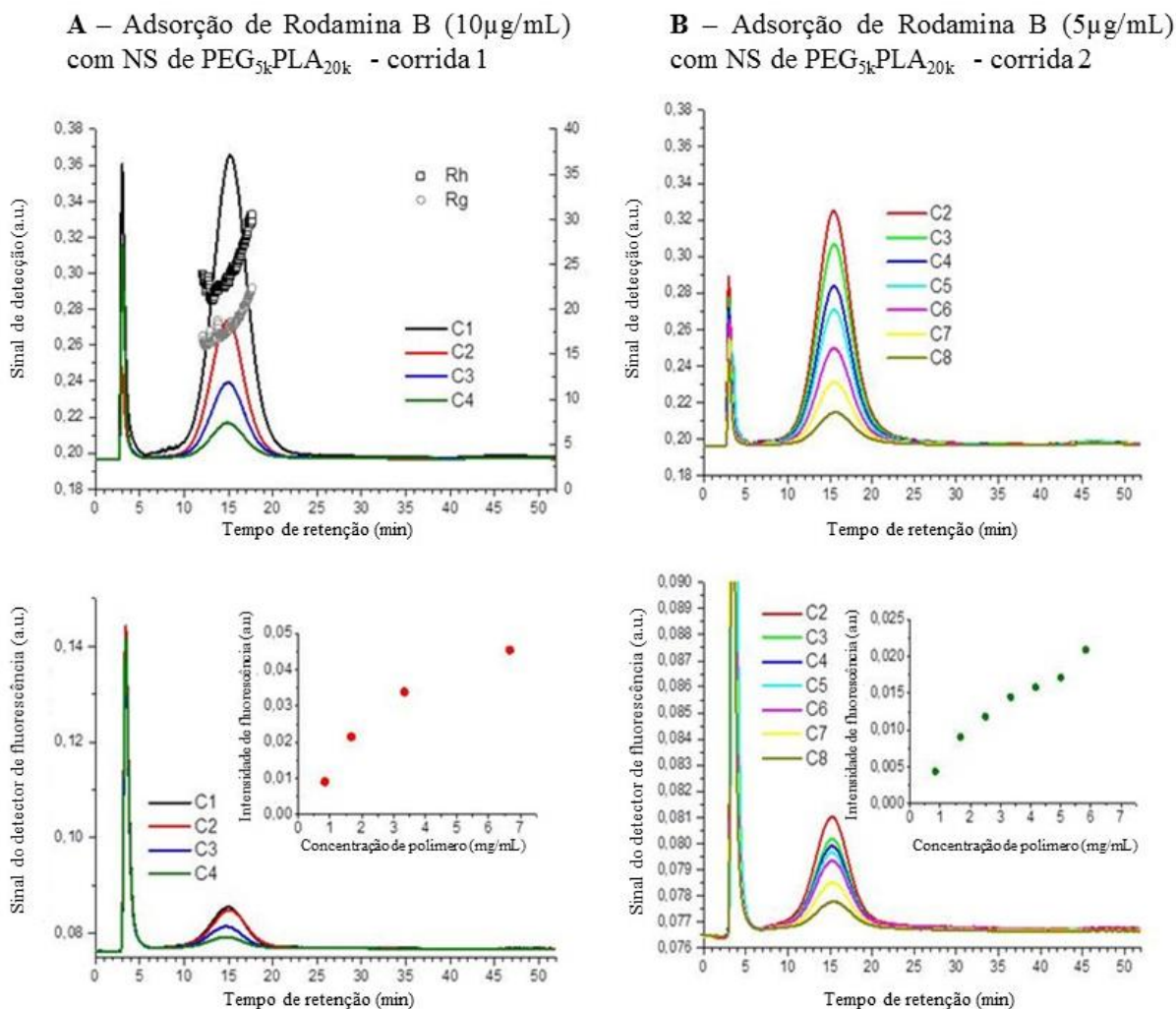
As frações foram caracterizadas por DLS, MALS e fluorescência foi observado um aumento linear na intensidade do sinal com o aumento da concentração das NS, indicando que a distribuição do tamanho e o diâmetro das amostras não foram afetados. O aumento do sinal de fluorescência também foi proporcional a concentração das NS, nas execuções 1 e 2 e também a intensidade da fluorescência está diretamente relacionada a concentração do marcador adsorvido a superfície das NS, indicado na figura 14.

Figura 14: Espectro do sinal de detecção de fluorescência da Rodamina B em concentrações crescentes de NS de PEG5kPLA20k



Na corrida 1 foram feitas injeções com o aumento das concentrações das NS na corrida 2 injetou-se primeiro na ordem decrescente das concentrações de NS seguidas pelo aumento das concentrações de NS. A ordem em que as amostras foram injetadas interferiu no valor da intensidade de fluorescência como pode ser visto na figura 15 (B linha inferior).

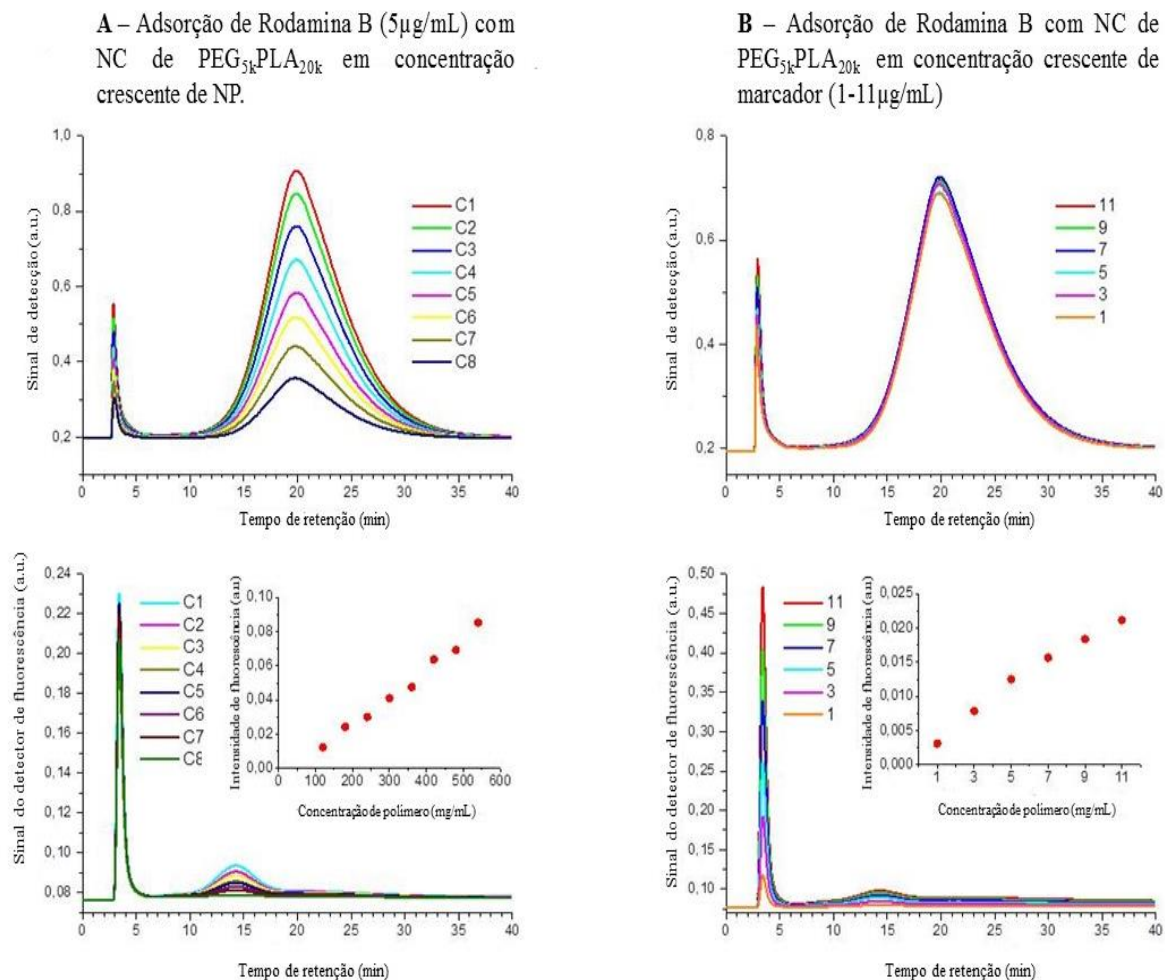
Figura 15: Estudo AF4 da adsorção do marcador Rodamina B a nanoesferas de PEG5kPLA20k.



Os gráficos representam a intensidade do sinal (detector MALS, linha superior A e B) e fluorescência (linha inferior A e B) e inserem a área sob a curva da intensidade do sinal de fluorescência, em função da concentração das NS (da maior concentração C1 a menor C8 concentração).

Para as NC de concentração variável e fixa de marcador também houve um aumento constante da quantidade de marcador adsorvido na NC, indicando que a associação do marcador foi igual as NP, indicados na figura 16 (A, linha superior e inferior respectivamente). Para as NC em concentrações fixas a intensidade do sinal se manteve constante e para a emissão de fluorescência foi observado que o aumento da concentração do marcador que não seguiu uma relação linear, como representados figura 16 (B, linha superior e inferior, respectivamente).

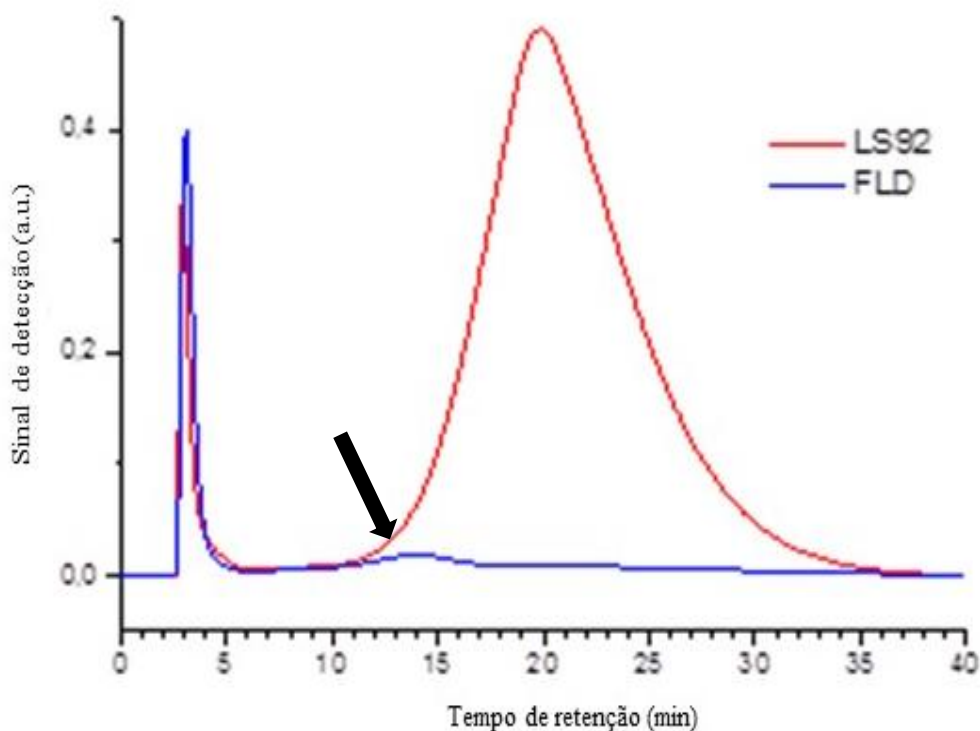
Figura 16: Estudo AF4 da adsorção do marcador Rodamina B a nanocápsulas oleosas de PEG5kPLA20k



As NC foram incubadas em concentrações crescentes (120 – 540 µg/mL), em meio aquoso com Rodamina B a 5 µg/mL (A) ou em concentração fixa de NC de 360 µg/mL e concentração de marcador variável de 1-11 µg/mL (B).

Pode-se observar que através do experimento com AF4 houve uma adsorção seletiva do marcador com o tamanho das NC e que a maior fração de fluorescência é dada por uma pequena parte de partículas de pequeno tamanho dentro da distribuição do tamanho total, representado na figura 17. Isso não foi observado em amostras de NS, onde a fluorescência foi distribuída uniformemente ao longo da distribuição de tamanho da amostra.

Figura 17: Comparação entre a intensidade do sinal e sinal de fluorescência para Rodamina B adsorvida a NC.



Sinal LS 92°: Intensidade do sinal – MALS e FLD: Sinal de fluorescência

Foi observado a partir dos resultados que o experimento apresenta baixa reprodutibilidade no sinal de fluorescência para as NS, pois apresenta elevado sinal no volume morto e também presença de resíduos de marcador em sequências longas de injeção, indicando que o marcador está em excesso para interagir com o canal de separação ou não apresenta boa afinidade com as NS. A partição do marcador a NS para o canal e conseqüentemente a fraca reprodutibilidade dos dados de fluorescência constituem uma limitação da técnica de AF4-FLD para a quantificação do marcador adsorvido na superfície do NP.

E para as NC o sinal de fluorescência associado ao volume morto foi muito forte e a intensidade do sinal foi baixo. Isto pode ser explicado por uma grande quantidade de marcador livre no meio disperso da amostra. Mosqueira e colaboradores (2001), demonstraram, utilizando centrifugação em gradiente de glicose, que NC é uma mistura complexa, que provavelmente contém uma pequena fração de NS, micelas e gotículas de óleo além de NC, que pode ter uma maior afinidade pelo marcador com diâmetros maiores.

9. CONCLUSÃO

O estudo de adsorção convencional do Rosa Bengala nos permite concluir que não é o método mais adequado para determinar a hidrofobicidade das nanopartículas poliméricas com polímeros biodegradáveis em grau de hidrofobicidade distintas, por não apresentarem a ordem de hidrofobicidade dos polímeros baseados no log P.

A partir da avaliação técnica de fracionamento em campo de fluxo assimétrico (AF4) demonstra que há um potencial para estudar em detalhes a adsorção de marcadores fluorescente a nanopartículas poliméricas a partir dos resultados obtidos, mas apresenta limitações devido a diferenças no comportamento fotofísico relacionado a perda da fluorescência quando em meio aquoso. Mediante aos resultados promissores obtidos pelo AF4, essa técnica poderá ser utilizada para avaliar outros sistemas nanoparticulados a fim de caracteriza-los sem um pré-tratamento da amostra.

Não houve necessidade de preparar e caracterizar os quatro tipos de polímeros PCL, PLA, PLGA, PEG-PLA. A avaliação de PEG-PLA e PCL foram suficientes para descartar o método, pois apenas as NP de menor tamanho apresentaram fluorescência, justificando descontinuar o estudo comparativo.

10. REFERÊNCIAS

COTY, J.B. **Characterization of nanomedicines: A reflection on a field under construction needed for clinical translation success.** Journal of Controlled Release, 2018, 275: 254-268.

D'ADDIO, SM. **Effects of block copolymer properties on nanocarrier protection from in vivo clearance.** Journal of Controlled Release, 2012, 162: 208-217.

DOKTOROVOVA, S. **Modified Rosa Bengala assay for surface hydrophobicity evaluation of cationic solid lipid nanoparticles (cSLN).** European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2012, 45: 606-612.

FESSI, H. **Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement.** International Journal of Pharmaceutics, 1989, 55: R1-R4.

GESSNER, A. **Nanoparticles with decreasing surface hydrophobicities: influence on plasma protein adsorption.** International Journal of Pharmaceutics. 2000, 196, 2: 245-249.

KAMALY, N. **Degradable Controlled-Release Polymers and Polymeric Nanoparticles: Mechanisms of Controlling Drug Release.** Chemical Reviews, 2016, 116: 2602-63.

KUMARI, A. **Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems.** Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2010, 75:1-18.

MILLER, T. **Comparative Investigations on In Vitro Serum Stability of Polymeric Micelle Formulations.** Pharmaceutical Research, 2012, 29:448-459.

MOSQUEIRA, V.C.F. **Relationship between complement activation, cellular uptake and surface physicochemical aspects of novel PEG-modified nanocapsules.** Biomaterials, 2001, 22, 22, 2967-2979.

MULLER, RH. **Influence of fluorescent labelling of polystyrene particles on phagocytic uptake surface hydrophobicity, and plasma protein adsorption.** Pharmaceutical Research, 1997, 14: 18-24.

OLIVEIRA, L.T. **Impact of dose and surface features on plasmatic and liver concentrations of biodegradable polymeric nanocapsules.** European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2017, 105: 19-32.

POUND-LANA, G.E.N. Phthalocyanine photosensitizer in polyethylene glycol-block-poly(lactide-co-benzyl glycidyl ether) nanocarriers: probing the contribution of aromatic donor-acceptor interactions in polymeric nanospheres. 2019, 9: 220-233.

SCHAFFAZICK, SR. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. Química Nova, 2003, 26: 726-737.

TRINDADE, IC. Mechanisms of interaction of biodegradable polyester nanocapsules with non-phagocytic cells. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2018, 124: 89–104.

TYLER, B. Polylactic acid (PLA) controlled delivery carriers for biomedical applications. Advanced Drug Delivery Reviews, 2016, 107:163-75.

VIEIRA, DB; GAMARRA, LF. Advances in the use of nanocarriers for cancer diagnosis and treatment. Einstein, 2016, 14,1: 99-103

XIAO, RZ. Recent advances in PEG–PLA block copolymer nanoparticles. Dovepress Journal: International Journal of Nanomedicine, 2010, 25:1057-1065.

XIAO, Y; WIESNER, MR. Characterization of surface hydrophobicity of engineered nanoparticles. Journal of Hazardous Materials, 2012, 215–216, 146-151.

ZATTONI, A. Flow field-flow fractionation for the analysis of nanoparticles used in drug deliver. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2014, 87: 53-61.